

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

16

(11)Publication number : 05-244875

(43)Date of publication of application : 24.09.1993

(51)Int.Cl.

A23J 1/20

A23L 1/305

(21)Application number : 04-034231

(71)Applicant : SNOW BRAND MILK PROD CO LTD

(22)Date of filing : 24.01.1992

(72)Inventor : KATO TSUNEO

SERIZAWA ATSUSHI

ISHIKAWA HIDETOSHI

AMAYA MIEKO

AHIKO KENKICHI

(54) METHOD FOR RECOVERING LACTENIN FRACTION HAVING HIGH ACTIVITY

(57)Abstract:

PURPOSE: To efficiently carry out the recovery of a lactenin fraction, containing an active immunoglobulin, a lactoferrin and a lactoperoxidase, excellent in antimicrobial properties and useful as a food, a medicine, etc., by treating skim milk under specific conditions.

CONSTITUTION: Skim milk is brought into contact with a sulfated polysaccharide substance such as sulfonated chitosan and an adsorbed fraction is then eluted with a salt solution to recover a fraction containing a lactoferrin and a lactoperoxidase. An unadsorbed fraction is subsequently coagulated with an acid or rennet to provide a whey fraction, which is then subjected to salting out treatment to recover a fraction containing an immunoglobulin. The recovered fraction containing the lactoferrin and lactoperoxidase is subsequently combined with the fraction containing the immunoglobulin and desalting and removal of a low-molecular fraction are carried out by using an ultrafiltration membrane having ≥ 50 kD to recover a lactenin fraction containing the active immunoglobulin, lactoferrin and lactoperoxidase.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 22.01.1998

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 2985158

[Date of registration] 01.10.1999

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	F I
A 2 3 J 1/20		A 2 3 J 1/20
// A 2 3 L 1/305		A 2 3 L 1/305

請求項の数3(全 4 頁)

(21)出願番号	特願平4-34231	(73)特許権者	000006699 雪印乳業株式会社 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号
(22)出願日	平成4年(1992)1月24日	(72)発明者	加藤 恒夫 北海道札幌郡広島町字大曲349-75
(65)公開番号	特開平5-244875	(72)発明者	芹澤 篤 北海道札幌市東区本町一条4丁目3-15-203
(43)公開日	平成5年(1993)9月24日	(72)発明者	石川 秀敏 北海道札幌市西区八軒一条東2丁目2-33-606
審査請求日	平成10年(1998)1月22日	(72)発明者	天谷 三枝子 北海道恵庭市恵み野西6丁目14-11
		(74)代理人	弁理士 藤野 清也
		審査官	上條 肇

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 活性の高いラクテニン画分の回収方法

1

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】 工程① 脱脂乳を硫酸化多糖体に接触させ、ついで吸着画分を塩溶液により溶出させ、ラクトフェリン、ラクトパーオキシダーゼを含有する画分を回収する工程、

工程② 前記工程①の非吸着画分を酸またはレンネットを用いて凝固させ、ホエー画分を得て、このホエー画分を塩析処理し、免疫グロブリン含有画分を回収する工程、

工程③ 工程①及び工程②で回収された画分をあわせ、
10 脱塩および低分子画分を除去する工程からなる、活性な免疫グロブリン、ラクトフェリン及びラクトパーオキシダーゼを含有するラクテニン画分の回収方法。

【請求項2】 工程③の脱塩および低分子画分の除去工程が、50KD以上の限外濾過膜を用いて行うことを特徴と

2

する請求項1 記載の回収方法。

【請求項3】 硫酸化多糖体としてスルホン化キトサンを用いる請求項1 記載の回収方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、乳中に含有される抗菌性画分であるラクテニン画分を回収する方法に関する。本発明の方法で得ることのできるラクテニン画分は食品、医薬品、飼料等広範な利用が可能である。

【0002】

【従来の技術】 牛乳または乳清によってストレプトコッカス パイロゲネシス(*Streptococcus pyrogenesis*) の生育が阻害されることが知られており、この阻害物質に対しラクテニンと命名された(祐川金次郎著, 乳タンパク質, 118頁, 酪農技術普及学会刊, 1971年) 。しかし乳

中に存在する抗菌性物質は、単一のものではなく、現在は牛乳中の抗菌性物質として、ラクトフェリン、免疫グロブリン、リゾチーム、ラクトパーオキシダーゼ(LP0)などが確認されている。なかでも免疫グロブリン、ラクトフェリン、LP0は乳中の含有量も多く、相互作用を有している。これらの牛乳より得られた抗菌性物質を含有する画分をラクテニン画分と呼んでいる。

【0003】従来、免疫グロブリン、ラクトフェリン、LP0をそれぞれ回収する方法が提案されている。例えば、特開昭58-28233号公報には吸着担体にラクトフェリンを結合させたのち酸性溶液により溶出させる方法が開示されている。特開昭61-246198号公報にはアルギン酸やカラギーナンゲルを用いてラクトフェリンとLP0を精製する方法が開示されている。特開平1-86839号公報にはカルボキシル基またはスルホン基を導入したデキストランで被覆したシリカ粒子を用い、塩濃度勾配によってLP0とラクトフェリンを溶出する方法が開示されている。特表平3-502921号公報にはラクトフェリンとLP0を、乳清を原料として強陽イオン交換体に吸着させたのち、異なる濃度の塩溶液で連続して溶出して回収する方法が開示されている。これらの方法はそれぞれラクトフェリンの回収方法としては優れているものの、さらに免疫グロブリン及びLP0をあわせて回収する方法ではない。

【0004】なお、上記特開昭61-246198号公報ラクトフェリンとLP0が得られることが記載されているが、免疫グロブリンの回収ができることは開示されていない。また、特開平3-218318号公報にはロタウイルス感染症治療剤の製法として牛初乳のホエーを分子量10万の限外濾過処理を行い、ついで凍結乾燥処理を行い、免疫グロブリンとラクトフェリンに富む粉末を得る方法が開示されている。この方法で得られた粉末は免疫グロブリンが65%、ラクトフェリン5.7%を含んでいる。しかしLP0をどれくらい含有しているか記載されていない。

【0005】ラクテニン画分の抗菌性にはLP0の活性が重要であることは広く知られている。特開平3-193708号公報にはラクトフェリンがLP0の抗菌活性を増強することが開示されている。さらにZina Moldoveanuらは免疫グロブリンとLP0、ラクトフェリンが抗菌活性を示すために、相互に作用しあっていることを報告している〔Ann.N.Y.Acad.Sci., 409, 848-850, (1983)〕。LP0はさらに消化管内のチオシアン酸や過酸化水素と反応することにより、強い抗菌活性を示すことが知られており、ラクテニン活性を維持するためには必須な成分である。しかしこれまでに、免疫グロブリン、ラクトフェリン及びLP0 3成分の活性を保持したラクテニン画分は得られていない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明はラクテニン画分の回収方法について検討を進めた結果、従来報告され

ていたラクテニン画分と異なり、免疫グロブリン、ラクトフェリン及びLP0をそれぞれが生物学的に活性な状態で含まれているラクテニン画分を回収する方法を見出した。乳中のラクトフェリンとLP0は類似の精製方法を用いて回収できるが、免疫グロブリン画分はこの2成分とは異なった挙動を示すため、それぞれ別々に回収されていた。本発明者らはラクテニン画分の研究を進める過程において、これらの3成分を簡単な操作により、同一原料から容易に、しかも活性を保持したまま回収する方法をみいだした。従って本発明は、免疫グロブリン、ラクトフェリン及びLP0が活性な形で多量に含有するラクテニン画分を回収する方法を提供することを課題とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明は、次の工程①～③よりなる、免疫グロブリン、ラクトフェリン及びLP0がそれぞれ活性な状態で含まれているラクテニン画分を回収する方法である。

工程① 脱脂乳を硫酸化多糖体に接触させ、ついで吸着画分を塩溶液により溶出させ、ラクトフェリン及びラクトパーオキシダーゼを含有する画分を回収する工程、
工程② 前記工程①の非吸着画分を酸またはレンネットで凝固させ、ホエー画分を得て、このホエー画分を塩析処理し、免疫グロブリン含有画分を回収する工程、
工程③ 工程①及び工程②で回収された画分をあわせ、脱塩および低分子画分を除去する工程。

【0008】本発明においては、哺乳動物の分娩後早期の乳、特に、免疫グロブリン、ラクトフェリン及びLP0を高濃度に含有する原料として初乳を用いることが望ましい。免疫グロブリン、ラクトフェリン、LP0を高濃度に含有する乳としては、ヒト、ウシ、ヤギ、ヒツジなど分娩後1～7日以内、特に好ましくは、分娩後1～5日以内の初乳がラクテニン画分の含量も高いため適している。しかし、本発明では、これら以外の哺乳動物の初乳あるいは通常の泌乳期の乳であっても原料として使用可能である。

【0009】本発明では、まずこれらの乳を脱脂処理後、ラクトフェリン及びLP0を選択的に吸着する作用を有する硫酸化多糖体と接触させ、ラクトフェリン及びLP0を硫酸化多糖体に吸着させる。硫酸化多糖体としてはスルホン化アルギネート、スルホン化セルロース、スルホン化デキストラン、スルホン化キトサンなどを例示できるが、本発明においてはスルホン化キトサンが吸着効率の面からみて特に好ましい。スルホン化キトサンはスルホン化キトパールの名称で富士紡績から市販されており容易に入手可能である。スルホン化キトパールに導入されたスルホン基の量は、担体1ml当たり10～50 μ eqに調整されたものが本発明では好ましい。特に好ましくは担体1ml当たり27～40 μ eqに調整されたものである。担体ゲルは、脱脂乳容量の約0.5～5%を用いて吸着操作を行う。吸着操作は、バッチ処理や

担体を充填したカラムに脱脂初乳を通液する方法など種々の方法を採用できるが、特開平3-109400号公報に開示された回転型カラムを用いた循環法により吸着操作を行うことが吸着効率も高く好ましい。

【0010】担体はその後イオン強度0.2以下、pH5以下の水溶液もしくは緩衝液を用いて洗浄し、担体の間につまった不純物を洗浄する。洗浄後、担体をイオン強度0.5以上、pH5以上、好ましくはイオン強度0.7～2.0でpH6～8の水溶液または緩衝液で吸着画分の溶出を行う。このような緩衝液には、炭酸水素ナトリウム緩衝液等が用いられる。

【0011】一方、硫酸化多糖と接触させた後の非吸着画分は、酸もしくはレンネット処理により、カゼイン画分を凝固させ、濾過もしくは遠心分離してホエー画分を回収する。酸処理は、乳酸、塩酸等の酸を用いpH4.6に調整することにより、またレンネット処理は酵素力価10万U/g程度のレンネットを非吸着画分に添加することにより行われる。このような処理によってカゼイン画分を凝固沈殿させ、ホエー画分を採取する。ホエー画分からは塩析により免疫グロブリンを含む画分を分離する。免疫グロブリンは約40%飽和硫酸で沈殿することが知られており、この方法により回収することができる。沈殿画分を濾過により回収し、再度水に溶解し、不溶解物質を濾過により除いた後、上記の硫酸化多糖体吸着画分とあわせる。

【0012】この画分はラクトフェリン、LP0及び免疫グロブリンの他溶出に用いた塩、塩析に使用した硫酸が高濃度に含有されているため脱塩処理を行う。脱塩処理としては、透析、イオン交換、分子篩による脱塩などの方法を用いることが出来る。特に、本発明においては、50KD以下の分子量画分を限外濾過膜により除去する工程を採用することにより、脱塩、濃縮及びラクテニン画分の精製を同時に行うことができる。この限外濾過は電気伝導度あるいは硫酸イオン濃度を指標とすることにより、脱塩効果を判定できる。電気伝導度400 μ S/cmおよび硫酸イオン濃度0.29%（全固形分当たり）以下となった段階で限外濾過を終了させる。

【0013】以上の操作により、免疫グロブリン、ラクトフェリン及びLP0を含有するラクテニン画分を容易に回収することができる。この画分は乾燥処理により粉末化することができる。しかしラクテニン活性の失活をふせぐためには可能な限り低温条件での乾燥、例えば凍結乾燥等の処理を行うことが望ましい。

【0014】以下に本発明を実施例によりさらに詳細に説明する。

【実施例1】

ウシ初乳からのラクテニン画分の回収

工程① 分娩後1～5日経過のウシより搾乳し集めた初乳を遠心分離により脱脂乳とした。この脱脂初乳100kg（14℃に冷却）を、スルホン基導入量38.9 μ eq/ml・

ゲルのスルホン化キトパールSU-3（富士紡績製）を882ml 充填した内容積1474mlの回転型吸着装置（東京理化学）に通液した。通液速度は25kg/時間として通液した。回転型反応装置の回転数は30rpmに調整した。

【0015】工程② 次いで30～35℃の温湯40lを工程①と同様に通液し、洗浄を行った。洗浄は280nmの吸光度を測定し、吸光度が光路長1cmのセルを用いて測定した場合、0.01以下になることを確認し、洗浄を終了させた。

【0016】工程③ 洗浄後0.7M食塩水（0.5mMの炭酸水素ナトリウム NaHCO_3 ，pH7.0に溶解して調製する）約67.5lを工程①と同様な条件で通液し、溶出を行った。溶出は280nmの吸光度を測定し、吸光度が光路長1cmのセルを用いて測定した場合、0.015～0.020になることを確認した。溶出液66.5kgを回収した。この回収液の電気伝導度は26.5mS/cmであった。

【0017】工程④ 工程①で通液終了した脱脂初乳溶液104.5kgを回収し、この溶液にレンネットを約0.006%濃度になるように添加し、30℃で30分間ゆるやかに攪拌しながら酵素反応を行わせ、カード形成させた。凝固したカードを濾過により除き、ホエー画分を回収した。

【0018】工程⑤ ホエー溶液に硫酸を加え、硫酸40%飽和になるように調整し、10℃の冷蔵庫に一昼夜放置し、塩析を行った。翌日、0.5 μ mの濾過板をセットし濾過助剤としてセラライト（Celite-535）750gを用いて濾過層を形成させたフィルタープレスを用いて濾過を行った。沈殿画分6.3kgを回収した。

【0019】工程⑥ この沈殿画分に47lの水を加え、2時間緩やかに攪拌しながら蛋白画分を溶解させ、ついで0.2 μ mの濾過板をセットしたフィルタープレスを用いて濾過を行い、濾過助剤として添加したセラライトを除去し、あわせて除菌をおこなった。濾過液として44.5kgを回収した。

【0020】工程⑦ 工程③と工程⑥で得られた溶液を合わせ、50KDのUF膜をセットした限外濾過装置を用いて限外濾過濃縮を行った。濃縮液の電気伝導度及び硫酸イオン濃度を測定し、電気伝導度400 μ S/cm、硫酸イオン濃度0.29%（全固形分当たり）になった時点で濃縮操作を終了し、ラクテニン画分を回収した。ついでこの画分を凍結乾燥処理を行い、ラクテニン画分の乾燥粉末350gを得た。

【0021】

【実施例2】

ウシ通常乳からのラクテニン画分の回収

分娩後10日以上経過し、通常に搾乳しているウシより集めた牛乳100kgを遠心分離により脱脂乳とした。以下操作は実施例1の工程①～⑥と同様に操作を行い、ラクテニン画分を含む液30kgを得た。この濾過液を工程⑦として工程③及び工程⑥で得た溶液を合わせ、50KDのUF膜をセットした限外濾過装置を用いて限外濾過濃縮を行っ

10

20

30

40

50

た。濃縮液の電気伝導度及び硫酸イオン濃度を測定し、電気伝導度 400 μ S/cm、硫酸イオン濃度0.29%（全固形分当たり）になった時点で濃縮操作を終了し、ラクテニン画分を回収した。ついでこの画分を凍結乾燥処理を行い、乾燥粉末250 g を得た。

【0 0 2 2】

【実施例 3】

ラクテニン画分中の活性成分の分析

実施例 1 及び実施例 2 で得たラクテニン含有画分粉末中の免疫グロブリン、ラクトフェリン及びLP0 含量の測定

ラクテニン画分中の免疫グロブリン、ラクトフェリン、LP0 含量

	初乳回収画分 (実施例 1)	常乳回収画分 (実施例 2)
免疫グロブリン	33.4%	30 %
ラクトフェリン	2.9	4.4
L P O	1.21	3.2

【0 0 2 4】

【比較例】特開平3-218318号公報にはウシ初乳ホエーを脱脂、レンネット処理、限外濾過処理、濃縮により蛋白質含有量が75%を超える粉末の調製方法が開示されている。この粉末には免疫グロブリン、ラクトフェリン、LP0 が豊富に含有されていることが記載されている。この公報に開示された方法に従い実施例1 に示した初乳100k g を処理し、500gの粉末を得た。この粉末を実施例 2 と同様に活性成分の分析をおこなった。免疫グロブリン2 3.5%、ラクトフェリン1.43%が含有されていたがLP0 は検出されなかった。

フロントページの続き

(72)発明者 阿彦 健吉
北海道札幌市中央区宮の森一条 9 丁目 4
ー22

(56)参考文献 特開 昭58ー28233 (J P, A)

(58)調査した分野(Int.Cl.⁶, D B 名)

- A23J 1/20
- A23J 3/08
- A23L 1/305

- ① 免疫グロブリン含量
IgG含量として定量を行った。抗ウシ IgG 抗体（ヤギ）を用いたサンドイッチEIA 法により測定を行った。
- ② ラクトフェリン含量
抗ウシラクトフェリン血清（ウサギ）を用いたサンドイッチEIA 法により測定を行った。
- ③ LP0 含量
LP0活性を指標としてLP0 含量を測定した。回収したラクテニン画分中の活性成分は表 1の通りであった。

【0 0 2 3】

【表 1】

【0 0 2 5】

【発明の効果】本発明の実施により活性の高いラクテニン画分を容易に回収することが可能となる。また本発明操作は、①吸着溶出、②塩析、③限外濾過の簡便な3工程からなり、大量処理も可能であり、生産コストの低減も可能である。さらに従来の方法では回収することが困難であった、免疫グロブリン、ラクトフェリン及びラクトパーオキシダーゼの3成分を含有する画分として回収できるため、より活性の高いラクテニン画分を得ることが可能となる。